

自然界から分離した黒麹菌と実用焼酎麹菌との特性比較

秋田 修・大城衣賀・伏木愛香・境野 佑・阿部真紀

食生活科学科 食品加工学研究室

Characteristic comparison of wild black-*Aspergillus* isolated from field with commercial *Aspergillus* strains

Osamu AKITA, Iyori OSHIRO, Manaka FUSEGI, Yu SAKAINO and Maki ABE

Department of Food and Health Sciences, Jissen Women's University

Aspergillus luchuensis and *A. luchuensis* mut. *kawachii* (= *A. kawachii*) are used for koji-making in Japanese distilled liquor “awamori” and “shochu” production. The origin of these domesticated strains is thought to be a contaminant of wild black-*Aspergillus* from natural environment. We isolated black-*Aspergillus* from a fields. Isolated strains were identified as *A. tubingensis* (= *A. saitoi*) by the genomic structure analysis. Thai rice koji was prepared using two isolates and four commercial strains. The characteristics such as acidity, citric acid content, amount of myceliums of koji made by isolates were not remarkable different compared with that of *A. luchuensis* and *A. kawachii*. The activities of enzymes (α -amylase, acid tolerant α -amylase, glucoamylase, neutral protease, acid protease and acid carboxypeptidase) in koji of isolates were slightly lower than that of commercial strains. From these results, it is estimated that the present commercial *A. luchuensis* strains originated from black-*Aspergillus* living in the natural environment.

Key words : wild black-*Aspergillus* (野生黒麹菌), *Aspergillus luchuensis* (泡盛黒麹菌), citric acid (クエン酸), enzyme activity (酵素活性), awamori (泡盛)

1. はじめに

焼酎や泡盛製造用の麹製造にはクエン酸生産性の黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis* (旧名 *A. awamori*))¹⁾ やその変異株が用いられ、クエン酸でもろみが酸性となることで微生物の汚染を抑止している。また、黒麹菌が生産する酵素は清酒や味噌醸造に用いられている黄麹菌 (*A. oryzae*) の酵素に比べて耐酸性が高いとされている²⁾。このような特性を有する黒麹菌の麹の使用により、気温が高い鹿児島や沖縄でも微生物汚染度が低い焼酎もろみの製造が可能となっている³⁾。特に泡盛製造では、原料のタイ米全量を麹として仕込む全麹仕込みによってもろみ発酵の健全性を維持している。

焼酎製造に使用されている黒麹菌は、最近のゲノム解析結果等により、工業的クエン酸生産などに利用されているクロカビ (*A. niger*) とは異なることが明ら

かとなっている^{4,5)}。黒麹菌の起源は自然界から混入した野生黒アスペルギルスと考えられるが、焼酎製造に利用される過程で実用的適性を備えた菌株が変異株も含めて人為的に選抜され、現在の焼酎製造用黒麹菌の菌株群となっているものと推定される。カビの生態研究⁶⁾によれば、コウジカビ属はヒトの生活圏内の環境からは分離されるが、純然たる自然界からはほとんど分離されないとされており、これは農耕作物の存在とヒトの住環境がコウジカビ属の増殖に適した環境となっているためであると推定している。

本論文では、自然界から黒アスペルギルス属を分離し、焼酎製造に使用されている菌株とその諸性質を比較解析することで、焼酎製造用黒麹菌の特性を明らかにするとともに、その由来を考察することを目的として行った研究について報告する。

2. 実験方法

2-1. 自然界からの黒麹菌の分離方法

2-1-1. 分離源

大学構内の花（10種）、葉（3種）、根（1種）、コケ（2種）、キノコ（1種）、土壌（2試料）の計19試料を分離源とした。

2-1-2. 分離用 α 米培地の調製法

黒麹菌の分離には前報⁷⁾での検討によって子囊菌類の分離に適していた α 米培地を用いた。 α 米は70%精米 α 吟醸米（AUA-70 徳島製麹株式会社）を使用した。 α 米15gをガラスシャーレ（直径9cm 蓋つき）に入れ、アルミホイルで包みオートクレーブで殺菌（121℃、10分）した。

2-1-3. 試料添加方法と培養方法

クリーンベンチ内で殺菌済み α 米培地に滅菌水7.5mlを加え、野外から採取した試料を添加し、室温（20℃前後）で7日間培養した。

2-1-4. 菌株の分離方法

実体顕微鏡（Nikon SMZ-U）で観察し、分生子の色調や形態から黒麹菌と推定される菌株の分生子を滅菌済みガラス針で釣菌し、ポテトデキストロース寒天培地（PDA培地）に植菌した。生育した菌の分生子を再度釣菌しPDA培地に植菌することを繰り返して菌株を純化した。

2-2. 分離株の同定法

2-2-1. PCR法による同定

2-2-1-1. プライマーとPCR条件

フモニシン（Fum）遺伝子クラスタ類似配列のFum1_cons_primer & Fum15_cons_primer プライマーセット（オペロンバイオテクノロジー社オリゴヌクレオチドPCReadyTMプライマー）を用いてPCR Thermal cycler Dice（Takara）によりPCRを行った。1サンプルにつき、dH₂O 20 μ l、 \times 10 PCR reaction Buffer 2.5 μ l、10 mM dNTP Mix を調製した。この溶液24 μ lにプライマー1 μ lを加え、PCR増幅を行った。反応条件は95℃ 1 min を1サイクル、95℃ 20 sec、60℃ 30 sec、68℃ 30 sec からなるサイクルを25回行った。

2-2-1-2. アガロースゲル電気泳動

PCRの増幅産物について1% Agarose（Lonza SeaKemGTG, Agarose）を用いADVANCE 社製Mupid-2plusで100V、30分電気泳動後、Gel-Red（Biotium 社 Gel-Rednucleic Acid Stain10000 \times in DMSO）で染色しゲルのバンドを撮影した。

2-2-2. シークエンスによる解析

ゲノムDNAをテンプレートとして、Bt2a&Bt2bのプライマーセットで β -tubulin部分塩基配列のPCR増幅を行い精製後、プライマーBt2a及びBt2bによりダイレクトシークエンスを行った。また、cmdA-F&cmdA-Rプライマーセットでcalmodulin部分塩基配列のPCR増幅を行い精製後、プライマーcmdAseq1及びcmdAseq2によりダイレクトシークエンスを行った。実験で使用したプライマーセットを表1に示した。

表1 黒麹菌同定用のPCR解析用プライマーおよびシークエンス用プライマー

Name	Sequence	Tm
Fum1_cons_primer	5'-GGCGGCATTGAGATCAGCACATTGGA-3'	63
Fum15_cons_primer	5'-GAAGGTAACCCGACAGTAACCTGCCAGGCC-3'	68
Bt2a	5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTC-3'	70
Bt2b	5'-ACCCTCAGTGATGACCTTGGC-3'	70
cmdA-F	5'-GCCGACTCTCTGACCGAAGAG-3'	61
cmdA-R	5'-TTTATTTTGCATCATGAGCTGGA-3'	53
cmdAseq1	5'-AGGCCAGATCACCAAA-3'	55
cmdAseq2	5'-GTCGCGGTGCAAGACCTT-3'	57

2-3. 泡盛米麹の製造方法

2-3-1. 使用菌株

野外からの分離株に加えて、実用株である（株）ビオックから分譲された泡盛黒麹菌KBN2012（*A. luchuensis* var. *awamori*）、焼酎K型菌KBN2001（*A. luchuensis* mut. *kawachii*）、焼酎用黄麹菌KBN1015（*A. oryzae*）、焼酎用融合株KBN2097（*A. oryzae* と *A. luchuensis* var. *saitoi* = *A. tubingensis* の細胞融合株）を用いた。分生子懸濁液は、麹エキスを寒天培地に各菌株を植菌し、30℃で7日間培養後、滅菌した0.05% Tween80溶液を添加しコンラージ棒で分生子を掻き取りガラスフィルターでろ過したろ液を遠心分離にて分生子を回収し0.05% Tween80溶液に再懸濁して調製した。分生子数はトーマ血球計算盤にて計数した。

2-3-2. 泡盛米麴の製造

タイ米（香り米「ゴールドフェニックス」チアメン社）3 kg を 55℃ の温水で 40 分間浸漬後、30 分水切りし、スチームコンベクションオープン（スチコン）で 99℃ 45 分蒸きょうした⁸⁾。放冷した蒸米を 6 分割し、各麹菌の分生子懸濁液を 1×10^5 個/米 1 g となるよう植菌し、こうじ君 5S（池田機械工業㈱）で 35℃ 40 時間培養して製麴した。

2-4. 泡盛米麴の分析

酸度は米麴 10 g に蒸留水 50 ml を加え、室温で 5 時間連続振とう抽出し No.5C のろ紙でろ過したろ液 10 ml を 0.1 N の NaOH による中和滴定値として求めた⁹⁾。クエン酸は同じろ液を用い酵素法（E-キットクエン酸、㈱ J.K インターナショナル）で定量した。

2-5. 麴中の菌体量の測定

麹菌菌体量の測定は yatalase で麹菌細胞壁溶解後に遊離した N-アセチルグルコサミンを定量して菌体量に換算する藤井らの方法¹⁰⁾で行った。

2-6. 酵素活性測定法

2-6-1. 粗酵素液の調製法

米麴 5.0 g に 0.5% 食塩を含む 100 mM 酢酸緩衝液（pH 5.0）を 50 ml 加え、室温で 3 時間時々攪拌しながら抽出し、No.5C のろ紙でろ過したろ液を粗酵素液とした。

2-6-2. 酵素活性測定法

糖化力、 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性、酸性カルボキシペプチダーゼ活性の測定にはキッコーマン醸造分析キットを用いた。糖化力以外は分析キット取扱説明書記載の換算係数を用いて国税庁所定分析法¹¹⁾による活性値に変換した。耐酸性 α -アミラーゼ活性は国税庁所定分析法によって測定した。酸性プロテアーゼ（pH3.0）、中性プロテアーゼ（pH6.0）活性の測定は醸造・食品学実験書記載の方法¹²⁾に従って行った。

2-7. 泡盛もろみの製造

2-7-1. 仕込み方法

全麴仕込みで 1 段仕込みとした。米麴 400 g に蒸留水 680 ml を加え、泡盛 1 号酵母を仕込水 1 ml あたり 3.2×10^5 となるよう添加した。発酵は仕込容器を水温 25℃ の恒温水槽中に保持し 15 日間行った。

2-7-2. 仕込み経過中の成分分析

アルコール濃度はガスクロマトグラフィー（GC 法）で内部標準法によりキャピラリーカラム（J&W DB-WAX、0.32 mm \times 30 m、液相（PEG））を装填した SHIMADZU GC-14B を用い、カラムオープン温度 100℃、注入口温度 200℃、FID 検出器温度 250℃ の条件で測定した。pH は pH メーター（HORIBA コンパクト pH メーター B-71X）で測定した。グルコースは酵素法（F-キット（R-Biop））で定量した。

2-7-3. もろみ上槽液の成分分析

発酵 15 日目のもろみを遠心分離（8000 rpm、10 分）した上澄液をもろみ上槽液とした。

アルコール度数は酒精度浮ひようで測定した。酸度は 0.1N の NaOH による滴定法、有機酸量は高速液体クロマトグラフ（有機酸分析システム、日本分光㈱）で測定した。

2-7-4. もろみ上槽液の蒸留と留液の分析

500 ml 容丸底フラスコにもろみを 300 ml を入れ、常圧蒸留により初留も含めて留液 100 ml を回収した。留液のアルコール度数は酒精度浮ひようで測定した。

香気成分は留液を 2.5 倍に希釈してヘッドスペース GC 法で測定した。キャピラリーカラム（J&W DB-WAX 0.32 mm (I.D.) \times 30 m）を用い、カラム温度 80℃、注入口温度 200℃、FID 検出器温度 250℃、RANGE 10^1 とした。アルコール類の内部標準としてノルマルアミルアルコールをエステル類の内部標準としてカプロン酸メチルを用いた。10 ml 容バイアル瓶に試料 2 ml と内部標準液 200 μ l を加えスクリュウキャップをして 50℃ 30 分保温後、加温したシリンジを用いてヘッドスペースガス約 1 ml を注入した。標準試薬の保持時間との比較で各成分の同定を行った。

官能評価は本格焼酎鑑評会の審査カード¹³⁾を参考にして香り、味、原料特性、総合評価について行った。

3. 実験結果および考察

3-1. 野外からの分離株の同定結果

コケ2種、八重桜の葉、グラウンドの土壌から黒アスペルギルス属と思われる4株を分離できた。これらの株を純化後に同定を行った。

Fum 遺伝子クラスタ類似配列のPCR解析では、分離株はいずれも1.1-kbのシグナルが得られ、*A. luchuensis* typeと推定された。なお、*A. niger* typeでは6.0-kbのシグナルが得られることから分離株は*A. niger*ではないと判定した。 β -tubulin 遺伝子の部分塩基配列とcalmodulin 遺伝子の部分塩基配列からは分離株4株すべてが*A. tubingensis* (*A. saitoi*)と同定された。1970年代に泡盛麹に使用されていた黒麹菌の分布では*A. saitoi*が*A. awamori*と同頻度で分離されており¹⁴⁾、*A. saitoi*も泡盛製造用の代表的な黒麹菌である。ゲノム解析による系統図では*A. nige*よりも*A. luchuensis*に近くカビ毒生産性はないとされている⁵⁾。

コケから分離された株（分離株（コケ））と八重桜の葉から分離された株（分離株（八重桜の葉））の2株を以後の泡盛麹の製造に使用した。

3-2. 泡盛醸造用麹の製造結果

3-2-1. 泡盛麹の分析結果

蒸米調製法の検討を蒸し器、オートクレーブ、スチコンを用いて行った。その結果、スチコンで最も適度な蒸米となったので、スチコンで蒸煮した蒸米を麹製造に用いた。蒸上がりは均一であったがやや硬めの蒸米となった。出麹温度は35℃～38℃であり全ての麹で菌糸がよく繁殖しハゼ落ちはほとんどなかった。胞子が着生し麹全体に胞子の色が認められた。

麹抽出液の酸度とクエン酸量を表2に示した。酸度にはクエン酸の寄与が大きく、酸度とクエン酸の相関係数は0.988と高かった。焼酎麹の酸度の標準は4～6とされているが¹⁵⁾、焼酎K型菌と分離株（コケ）以外は標準より低い値となった。蒸米が硬めの場合は酸度が少なくなるとされており¹⁶⁾、やや蒸米が硬めであったことが影響した可能性がある。クエン酸生産性がない黄麹菌が0.30、黄麹菌と黒麹菌の融合株では1.15と酸度が低かった。黄麹菌の米麹を焼酎もろみに使用する場合にはクエン酸や乳酸を添加して微生物汚染を防ぐこともなされている。また、現場での製造では出麹の酸度が3以下の場合はクエン酸で補酸するこ

表2 泡盛麹の酸度とクエン酸

麹菌株	酸度	クエン酸(%)
泡盛黒麹菌	3.00	4.73
焼酎K型菌	4.30	6.76
焼酎用黄麹菌	0.30	0.29
焼酎用融合株	1.15	2.53
分離株(コケ)	4.35	6.13
分離株(八重桜の葉)	3.45	6.12

とが奨励¹⁷⁾されているが、今回の実験では全て補酸をしない全麹仕込みで行った。

クエン酸量ではクエン酸生産性が低い黄麹菌で0.29%と最も低い値となった。黒麹菌系（泡盛黒麹菌、焼酎K型菌、分離株（コケ）、分離株（八重桜の葉））では4.73～6.76%のクエン酸生成が認められた。黄麹菌と焼酎麹菌との融合株では2.53%と黄麹菌と黒麹菌系の中間の値であった。

3-2-2. 麹の菌体量の測定結果

各菌株で製造した麹中の菌体量の測定結果を表3に示した。

分離株（コケ）が7.25 mg/g 麹で最も少なく、融合株が11.67 mg/g 麹と最も多かった。比嘉ら¹⁶⁾は泡盛麹の菌体量は製麹条件によって異なり3～9 mg/g 麹と報告している。また、麹菌の生育がよすぎるとでんぷんが消費され純アルコール取得量が低下するため泡盛工場では約4～5 mg/g 麹と菌の増殖を抑制した製麹をしていると報告している。今回製造した麹ではいずれの麹菌も生育が旺盛であり、泡盛製造用としては増殖過剰とも考えられたが、以後の実験での酵素活

表3 泡盛麹中の菌体量

麹菌株	菌体量 (mg/g麹)
泡盛黒麹菌	9.43
焼酎K型菌	11.05
焼酎用黄麹菌	11.50
焼酎用融合株	11.67
分離株(コケ)	7.25
分離株(八重桜の葉)	7.66

性値などから泡盛製造に使用しうる麹であると判断した。

3-2-3. 泡盛麹の各種酵素活性

i) 糖化系酵素の活性

泡盛麹の糖化力の測定結果を図 1 に示した。糖化力は還元糖の生成活性を表すが、グルコアミラーゼ活性とほぼ同様の傾向が認められ融合株が高い値を示した。

α -アミラーゼ活性、耐酸性 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性を図 2～図 4 に示した。 α -アミラーゼは一般に *A. oryzae* (黄麹菌) の米麹で活性が高く、それに比べると黒麹菌による米麹では低い傾向にある¹⁸⁾。今回の結果でも焼酎用ではあるが黄麹菌が最も高い活性を示した。また黄麹菌と黒麹菌の融合株も他の黒麹菌系の株に比べて高い活性を示した。黒麹菌系では実用株に比べて分離株の活性が低かった。

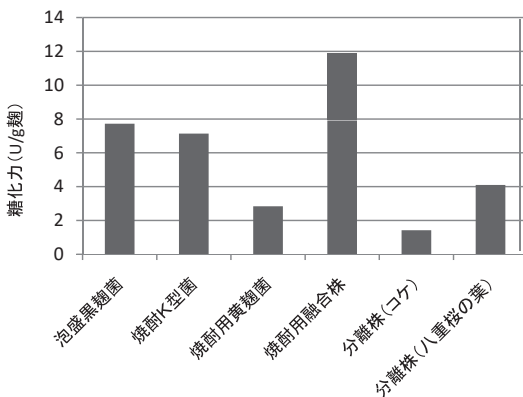


図 1 泡盛麹の糖化力

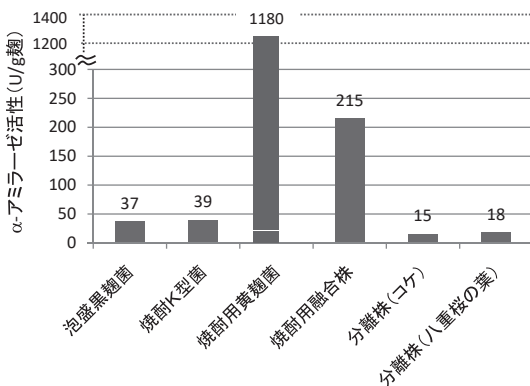


図 2 泡盛麹の α -アミラーゼ活性

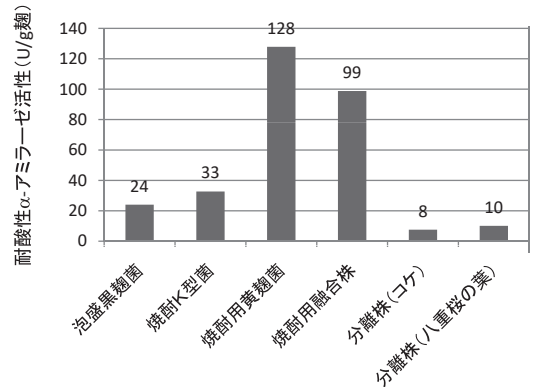


図 3 泡盛麹の耐酸性 α -アミラーゼ活性

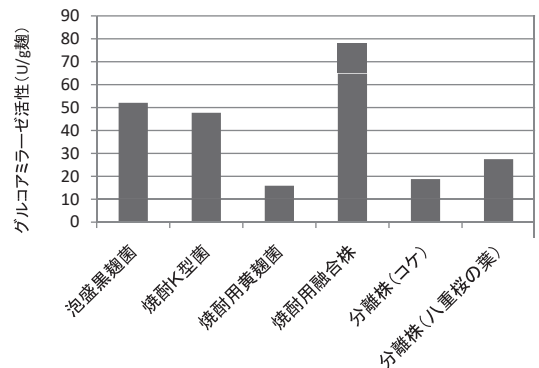


図 4 泡盛麹のグルコアミラーゼ活性

耐酸性 α -アミラーゼ活性は、いずれの株においても α -アミラーゼ活性よりも低かったが、両酵素活性間には相関が認められ相関係数は 0.849 であった。耐酸性 α -アミラーゼ活性の α -アミラーゼ活性に対する割合は、泡盛黒麹菌 65%、焼酎 K 型菌 84%、焼酎用黄麹菌 11%、焼酎用融合株 46%、分離株 (カビ) 51%、分離株 (八重桜の葉) 56% であり、表 2 の麹のクエン酸量との相関係数は 0.864 あった。黒麹菌はクエン酸を生成して麹中の環境が酸性となるため α -アミラーゼの耐酸性が高いものと思われる。

グルコアミラーゼは分離株の活性が他の菌株より低かった。穀類等を原料に用いる醸造食品製造用の実用麹菌株ではでんぷん分解力が高いことが求められるため、糖化系の酵素活性の高い菌株が選抜されてきたと推定される。このような選抜を受けていない分離株 (野生株) では、 α -アミラーゼ、耐酸性 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性が実用株よりも低かった。

ii) タンパク質分解系の酵素活性

中性プロテアーゼ活性は分離株（コケ）が最小（894 U/g 麹）で融合株が最大（1282 U/g 麹）であったが株間での大きな差は認められなかった（図5）。

酸性プロテアーゼ活性は融合株も含めた黒麹菌では408～624 U/g 麹の範囲であったのに対して黄麹菌は207 U/g 麹と他の菌株の33～50%の活性しかなかった（図6）。酸性プロテアーゼ活性は表2に示したクエン酸の生産性と相関（相関係数0.78）しており、黒麹菌が酸性条件下で生育するために酸性プロテアーゼ活性も高いものと推定された。

酸性カルボキシペプチダーゼ活性は黄麹菌を除いた焼酎用麹菌で活性が高かった。野外からの分離株2株は黄麹菌よりは高いものの焼酎用麹よりは低かった（図7）。野生株を由来とする菌株が実用株として使用される過程で活性の高い株が選抜されてきたことを示す結果かもしれないが、野生株の試料数が少ないので断定はできない。

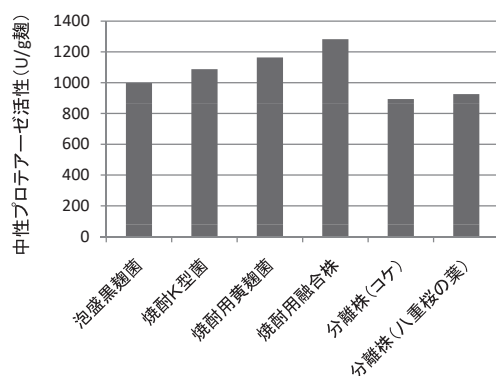


図5 泡盛麹の中性プロテアーゼ活性

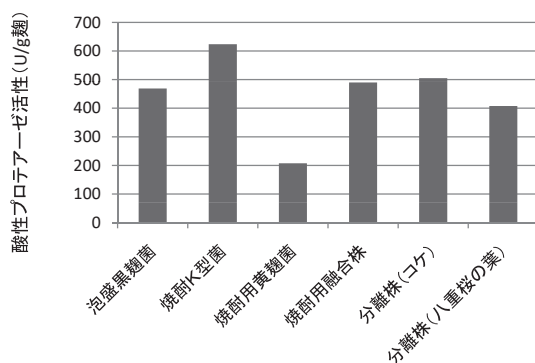


図6 泡盛麹の酸性プロテアーゼ活性

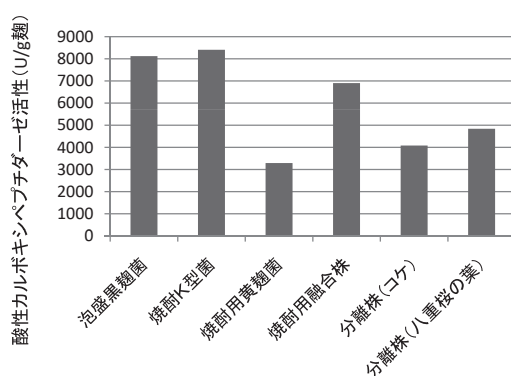


図7 泡盛麹の酸性カルボキシペプチダーゼ活性

3-2-4. 泡盛もろみの製造

発酵経過中の成分変化を表4に示した。5日目のアルコール生成量から判断した初期の発酵程度は、焼酎K型菌が最も早く、黄麹菌と分離株（コケ）でやや遅れ気味であったが他の3株では同等であった。最終的には分離株（八重桜の葉）が12.3%と低い値となったが、他の株では13.4～14.2%であり顕著な差はなかった。実際の泡盛もろみでは17%程度となる¹⁶⁾のに比べて低い値となったが、種麹を使用せず酵母仕込としたことや汲水歩合等の影響と考えられる。5日目のpHは黄麹菌、融合株でやや高めであったが黒麹菌系はpH3.2以下と低かった。グルコースは発酵期間中を通して1%前後であった。

3-2-5. もろみ上槽液の成分

もろみ上槽液の成分を表5に示した。アルコールは13.2%から14.7%であった。酸度は黄麹菌で5.5、融合株で5.8と低く、黒麹菌系は6.9から7.1と高かったが一般の泡盛もろみの酸度が9以上ある¹⁷⁾のに比べるとやや低かった。有機酸分析結果から黒麹菌系で

表4 発酵経過中の各種成分変化

	アルコール(%)			pH			グルコース(%)		
	5日目	10日目	15日目	5日目	10日目	15日目	5日目	10日目	15日目
泡盛黒麹菌	5.6	11.9	13.6	3.2	3.4	3.5	0.8	1.0	0.9
焼酎K型菌	7.2	14.0	13.6	3.1	3.3	3.4	0.8	1.1	0.5
焼酎用黄麹菌	3.4	11.8	13.4	3.8	3.6	3.7	0.8	0.5	0.0
焼酎用融合株	5.5	12.1	14.2	3.6	3.5	3.6	0.8	1.0	0.8
分離株(コケ)	4.6	12.9	13.7	3.2	3.4	3.6	0.9	0.6	1.1
分離株(八重桜の葉)	5.9	12.7	12.3	3.2	3.3	3.4	0.8	0.6	0.9

表5 もろみ上槽液の成分

	アルコール (%)	酸度	有機酸 (mg/L)				
			ビルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸
泡盛黒麹菌	13.2	6.9	0	1644	566	573	819
焼酎K型菌	13.2	7.7	0	1998	602	682	785
焼酎用黄麹菌	14.6	5.5	349	0	115	604	6947
焼酎用融合株	14.7	5.8	0	763	417	446	3732
分離株(コケ)	14.4	7.1	0	1678	591	515	670
分離株(八重桜の葉)	14.3	7.2	0	1532	675	700	671

は酸度はクエン酸によるものであるのに対して、黄麹菌と融合株ではクエン酸が少なく乳酸量が黒麹菌系の5倍から10倍と多く酸度は乳酸によるものと考えられた。黄麹菌および融合株の麹を用いたもろみでは初発酸度が低かったために乳酸菌が増殖し乳酸量が多くなったものと推定される。また、酢酸量も黒麹菌系の5倍程度多かった。

リンゴ酸量は黄麹菌のもろみで少なかったが他の菌株間では顕著な違いはなかった。黄麹菌のもろみでは乳酸菌によるマロラクティック発酵が生じたためにリンゴ酸が減少した可能性が考えられる。コハク酸量は菌株間で顕著な違いは認められなかった。

3-2-6. 蒸留液の成分と官能評価

蒸留液の成分を表6に示した。アルコール度数は35～39%であり単式蒸留しうちゅうの規格(45度以下)を満たしていた。

香気成分は黒麹菌系で製造したもののほうがイソブタノールとイソアミルアルコールの高級アルコール

類、酢酸イソアミルとカブロン酸エチルのエステル類が黄麹菌や融合株で製造したものよりも高い傾向が認められた。なお、もろみ上槽液の香気成分も測定したが、各成分の含量比率は蒸留液と一致しており、もろみで生成した香気成分はほぼそのまま蒸留液に回収されたものと考えられる。

官能評価結果を表7にまとめた。初留も回収したこと、蒸溜直後でガス臭も抜けていないことなどから、製品として評価したものではなく、焼酎(泡盛)として一定水準に達する可能性があるか、それぞれの麹菌の特性が認められるかについて評価したものである。

泡盛黒麹菌、焼酎麹菌を使用して製造したものは、初留臭はあるものの他に大きな欠点はなく、熟成すれば泡盛として一定の水準に達するレベルと判断した。分離株で製造したものは、香りについては泡盛黒麹菌、焼酎麹菌を使用して製造したものと比較して遜色がなかった。個性はあまりないものの香味ともにクセがなく泡盛として通用するレベルと思われる。野生の

表6 蒸留液の成分

	アルコール (%)	香気成分 (mg/L)				
		イソブタノール	イソアミル アルコール	酢酸エチル	酢酸 イソアミル	カブロン 酸エチル
泡盛黒麹菌	36	178	231	8.8	0.84	0.17
焼酎K型菌	37	160	258	10.2	1.19	0.21
焼酎用黄麹菌	35	109	133	56.5	0.13	0.11
焼酎用融合株	39	153	156	19.2	0.25	0.23
分離株(コケ)	35	176	211	12.6	0.35	0.12
分離株(八重桜の葉)	35	193	295	12.5	1.05	0.18

表7 蒸留液の官能評価結果

官能評価項目		泡盛黒麹菌	焼酎K型菌	焼酎用黄麹菌	焼酎用融合株	分離株(コケ)	分離株(八重桜の葉)
香り	調和	やや調和	やや調和	不調和	やや調和	普通	やや調和
	特性	豊か、芳香、上品	特徴がない	甘酒様の香り	芳香、上品	ソフト、おだやかな香り	ソフト、上品
	指摘項目	弱い初留臭	初留臭、弱い焦げ臭	酸臭、アセトアルデヒド集、低級脂肪酸の香り、麹臭が強い	弱い初留臭、弱いアセトアルデヒド臭 弱い酸臭	穀類の香り 弱いアセトアルデヒド臭	異臭はない
味	調和	調和	やや調和	不調和	普通	普通	やや調和
	特性	適度な甘さ、きれいな丸み	適度な甘さ、丸み		きれいな丸み、クセがなくスッキリした味	適度な甘さ、クセのない味	軽快
	指摘項目	弱い苦味、弱い渋み	あらい、弱い渋み	強い苦味、強い渋み、酸味	あらい	あらい、弱い苦味、弱い渋み	異味はない
原料特性		やや強い	強い	やや弱い	やや強い	やや強い	普通
総合評価		優良	良	不良	普通	良	良
短評		焼酎らしい香味であり調和もよい。製品とできるレベル	味がしっかりしており、米焼酎らしい香味特性あり。熟成すれば味が丸くなりよくなると思われる。	香味ともクセがあり不調和。製品にはできないレベル。	黄麹菌の特性が少し出ている。熟成すればよくなる可能性あり。	製品とできるレベル	軽やかな香味、飲みやすい、熟成して丸みが出れば上品な焼酎になる

麹菌を醸造酒の製造に使用することは安全上の不安があるが、不揮発成分を含まない蒸留酒の製造には使用できる可能性があるものと思われる。

黄麹菌や融合株で製造したものはアセトアルデヒド臭や酸臭があり乳酸菌が増殖したことの影響が認められた。特に黄麹菌で製造したものは、アルコール発酵はほぼ正常であったが、製品としては不適格な品質であった。黄麹菌の麹を使用する場合は、乳酸やクエン酸でもろみを補強し混入微生物の増殖抑制をすることが望ましいと思われた。融合株で製造したのもも弱い酸臭があり品質的には特に優れてはいなかったが、黒麹菌のものとは異なる特性があった。ウイスキー製造では麦汁の煮沸行程がないため、もろみに乳酸菌が生育することでより複雑な香味が形成されるとされており¹⁹⁾、乳酸菌の増殖も含めて融合株を泡盛の多様化に利用できる可能性もあると思われる。

4. まとめ

野外試料から分離した黒麹菌は全て *Aspergillus tubingensis* (= *A. saitoi*) であった。分離株2株と泡盛黒麹菌 (*A. luchuensis* var. *awamori*)、焼酎麹菌 (*A. luchuensis* mut. *kawachii*) を含む実用菌株を用いてタイ米で麹を製造した。全ての菌株の麹の酸度がやや低めとなったが、分離株でも焼酎麹菌と同程度のクエン酸が生成された。分離株では麹中の菌体量が少なかったことも影響し、各種酵素活性は泡盛麹菌や焼酎麹菌の麹と比べると低い傾向にあった。全麹仕込みで行った泡盛もろみでは、泡盛麹菌や焼酎麹菌の麹を用いたもろみと変わらない発酵経過となり、アルコール生成量は分離株のもろみでやや高くなった。もろみ蒸留液の香気成分は泡盛麹菌や焼酎麹菌の麹を用いたものと同等の含有量であった。官能評価では分離株の蒸留液は個性にはやや乏しいもののソフトな香りとクセのない味であり十分に商品化可能なレベルであった。

野外試料から分離した黒麹菌でもある程度のレベルの焼酎(泡盛)製造が可能であることを示す結果が得られたことから、現在使用されている焼酎製造用黒麹菌の起源は自然界からの混入であり、焼酎醸造に使用されてきた過程で生酸性や各種酵素活性の高めの菌株が選抜されて現在に至っている可能性が高いものと推察した。

謝辞

分離株のゲノム解析をして頂きました独立行政法人酒類総合研究所の山田修博士ならびに醸造用菌株に関するご助言と菌株を分譲して頂きました株式会社ビオックの和久豊博士に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 山田修: 学名が *Aspergillus luchuensis* になりました、日本醸造協会誌、110、64-67 (2015)
- 2) 岩野君夫: 本格焼酎製造技術、106-113、(財)日本醸造協会 (1991)
- 3) 村上英也編著: 麹学、71-78、(財)日本醸造協会 (1986)
- 4) Yamada, O. *et al.*: Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety., *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 233-237 (2011)
- 5) 山田修: 黒麹菌の分類と安全性について、醸協、107、200-204 (2012)
- 6) 浜田信夫: 朝日選書 人類とカビの歴史、187-189、朝日新聞出版 (2013)
- 7) 阿部真紀、小針清子、秋田修: 自然界から分離した黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) と醸造用黄麹菌の比較解析、実践女子大学紀要、49、7-14 (2012)
- 8) 豊川哲也: 品質工学を適用した泡盛醸造米の給水工程の最適化、醸協、110、678-686 (2015)
- 9) 注釈編集委員会編: 第四改正国税庁所定分析法注解、221-222、(財)日本醸造協会 (1993)
- 10) 藤井史子、尾関健二、神田晃敬、浜地正昭、布川弥太郎: 市販酵素剤を利用した麹菌体量簡易測定法、醸協、87、757-759 (1992)
- 11) 注釈編集委員会編: 第四改正国税庁所定分析法注解、222-228、(財)日本醸造協会 (1993)
- 12) 柳田藤治編: 醸造・食品学実験書、71-73、食品研究社 (1984)
- 13) (独) 酒類総合研究所; 第37回本格焼酎鑑評会について、酒類総合研究所報告、第187号、17-26 (2015)
- 14) 西谷尚道: 本格焼酎製造技術、28、(財)日本醸造協会 (1991)
- 15) 中野成美: 本格焼酎製造技術、90、(財)日本醸造協会 (1991)
- 16) 比嘉賢一、普天間樹、玉村隆子、沖縄県産種麹の利用方法について、沖縄県工業技術センター研究報告書、第14号、41-46 (2011)
- 17) 米元俊一、鮫島吉廣: 本格焼酎製造技術、131-133、(財)日本醸造協会 (1991)
- 18) 注釈編集委員会編: 第四改正国税庁所定分析法注解、215、(財)日本醸造協会 (1993)
- 19) 杉本淳一、ウイスキーの製造技術、日本醸造協会誌、97、188-195 (2002)